



TITLE:

In Vitro Disease Modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2 Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoids(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Korogi, Yohei

CITATION:

Korogi, Yohei. In Vitro Disease Modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2 Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoids. 京都大学, 2019, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2019-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22003>

RIGHT:

© 2019 The Author(s). This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Final publication is available at [https://www.cell.com/stem-cell-reports/fulltext/S2213-6711\(19\)30016-5](https://www.cell.com/stem-cell-reports/fulltext/S2213-6711(19)30016-5)

京都大学	博士（医学）	氏名	興梠 陽平
論文題目	<i>In Vitro</i> Disease Modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2 Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoids （ヒト iPS 細胞由来肺胞オルガノイドを用いたヘルマンスキー・パドラック症候群 2 型の疾患モデリング）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>ヘルマンスキー・パドラック症候群（HPS）は眼皮膚白皮症と出血傾向を特徴とする遺伝性疾患であり、リソソーム関連オルガネラの形成に関与する遺伝子が原因遺伝子となっている。2 型（HPS2）の原因遺伝子は AP3B1 であり、細胞内輸送に与る AP-3 複合体の β3A サブユニットをコードしている。HPS2 など HPS のいくつかの亜型では肺線維症が起こることが知られている。</p> <p>本論文ではまず、HPS2 患者由来の線維芽細胞から疾患特異的 iPS 細胞（HPS2-iPSCs）を樹立した。ドナーの遺伝子型は AP3B1 遺伝子のエクソン 15 と 18 にそれぞれナンセンス変異を有する複合ヘテロ接合体である。次に HPS2-iPSCs から CRISPR-CAS9 を用いた相同組換えによりエクソン 18 を修復した遺伝子修復 iPS 細胞（cHPS2-iPSCs）を樹立した。HPS2-iPSCs では AP3B1 の mRNA 発現や蛋白質発現の低下が確認され、AP-3 複合体の機能低下を反映して CD63 の細胞表面への発現の亢進も確認されたが、cHPS2-iPSCs ではこれらの異常が回復していた。次にこれらの iPS 細胞株の分化誘導を行った。HPS2-iPSCs と cHPS2-iPSCs はともに肺胞オルガノイドへ分化誘導が可能であり、それぞれの 1 型、2 型肺胞上皮細胞のマーカー発現、また線維化に関連したマーカー発現には有意差は認められなかった。続いて、2 型肺胞上皮細胞のリソソーム関連オルガネラであるラメラ体の形態を解析した。HPS2-iPSCs から作成された肺胞オルガノイド（HPS2-AOs）では cHPS2-iPSCs 由来の肺胞オルガノイド（cHPS2-AOs）と比較してラメラ体の分布に異常を認め、巨大なラメラ体が形成されることを確認した。これらの異常は HPS2 患者の他の臓器の細胞や HPS2 のマウスモデルにおいて報告されている変化だった。最後にラメラ体の分泌機能を評価した。肺サーファクタントの主成分であるリン脂質が細胞外に分泌されると発色する蛍光プローブ（FM1-43）を用いた生細胞イメージングでは、HPS2-AOs では cHPS2-AOs と比較して分泌刺激後のラメラ体分泌が低下していることが示唆され、実際に培養上清中に分泌されたリン脂質（ホスファチジルコリン）の量を測定したところ低下していた。</p> <p>以上より、HPS2-AOs と cHPS2-AOs の比較解析から HPS2 の肺線維症発症の背景には肺サーファクタントの分泌能低下に関与する可能性が示唆された。また、本論文によりヒト多能性幹細胞由来の肺胞オルガノイドが遺伝性の呼吸器疾患研究に応用可能なことが示された。</p> <p>本論文中ではさらに今後の肺の幹細胞研究に有用と考えられる新たな 2 つの事実を確認した。第一にヒト多能性幹細胞から効率よく肺胞上皮細胞を作成するための重要な段階として表面抗原 Carboxypeptidase M(CPM)を用いて NKX2-1 陽性の肺前駆細胞を単離する方法を用いてきたが、最近、海外より報告のあった CD47 と CD26 を組み合わせる方法とも比較した。その結果、前者の方が効率よく肺前駆細胞を単離できることが示された。第二に、ヒト成人肺やヒト多能性幹細胞由来の肺胞オルガノイドから 2 型肺胞上皮細胞を単離する方法として、細胞表面抗原 NaPi2b が有用であることを証明した。本論文中では同細胞表面抗原を用いて、2 型肺胞上皮細胞を単離し、継代培養を実現して疾患モデルに役立てた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)
本論文では肺線維症を来す遺伝性疾患であるヘルマンスキー・パドラック症候群 2 型 (HPS2) 患者から疾患特異的 iPS 細胞とゲノム編集によって遺伝子修復した iPS 細胞を樹立し、それらを分化誘導して肺胞オルガノイドを作成し、比較解析が行われた。各細胞から肺胞オルガノイドの作成が可能であり、1 型、2 型肺胞上皮細胞の分化マーカーの発現に有意差は認められなかった。2 型肺胞上皮細胞の肺サーファクタント分泌能を担うリソソーム関連オルガネラであるラメラ体の解析の結果、HPS2 疾患特異的 iPS 細胞から作成された肺胞オルガノイドではラメラ体の分布異常や巨大化が認められた。また生細胞イメージングと培養上清中に分泌されるホスファチジルコリンの定量化により HPS2 疾患特異的 iPS 細胞由来の肺胞上皮細胞では肺サーファクタントの分泌能低下が確認された。これにより HPS2 患者の肺線維症発症に肺サーファクタントの分泌低下に関与している可能性が示唆された。また、本論文中では細胞表面抗原 NaPi2b がヒト成人肺やヒト多能性幹細胞由来の肺胞オルガノイドから 2 型肺胞上皮細胞を単離する方法として有用であり、iPS 細胞由来の 2 型肺胞上皮細胞の継続培養が可能であることも示された。
以上の研究は遺伝性肺線維症の病態解明に向けてヒト iPS 細胞の利用可能性を示唆するものであり、今後の呼吸器疾患研究の発展に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、令和元年 6 月 2 0 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。